

**Aus dem Institut für klinische Molekularbiologie
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
Im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität**

**Molekularer Nachweis der TM7 Bakteriensubspezies bei
chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrecht-Universität
zu Kiel**

Vorgelegt von

Thomas Merkel

aus Rostock

Kiel 2009

1. Berichterstatter: PD Dr. Tanja Kühbacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

Gez.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung.....	1
1.1	chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED).....	1
1.2.	Intestinale Mikroflora bei CED	3
1.3.	Molekulare Nachweismethode von Bakterien mittels 16S rRNA.....	5
1.4.	TM7 Bakteriensubspezies.....	6
2	Ziele der Arbeit.....	7
3	Material Methoden.....	8
3.1	Materialien.....	8
3.2.	Methoden.....	11
3.2.1	Patienten und Probengewinnung.....	11
3.2.2	PCR.....	12
3.2.3	Gelelektrophorese und RNA-Isolation aus Agarosegel.....	13
3.2.4	Klonieren der RNA-Fragmente.....	14
3.2.5	Vorbereitungsschritte für das Sequenzieren.....	16
3.2.6	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH).....	17
3.3	Phylogenetische Analyse.....	18
3.4	Statistische Analyse.....	19
4	Ergebnisse.....	20
4.1	Zusammensetzung der Klonbibliotheken.....	20
4.2	In situ Hybridisierung.....	21
4.3	Phylogenetische Analyse und statistische Indikatoren der Klonbibliotheken.....	22
4.4	genetisch determinierte Antibiotikaresistenz.....	30
5	Diskussion.....	31
6	Zusammenfassung.....	33

7	Literaturverzeichnis.....	34
8	Verwendete Internetseiten und Datenbanken.....	40
9	Anmerkung zu den Sequenzen.....	41
10	Danksagung.....	42
11	Lebenslauf.....	43

Abkürzungen

5-ASA	Aminosalicylate
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
ACE	Abundance-based Coverage Estimator
Bakt.	Bakterien
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Biotin	Vitamin H
bp	Basenpaare
BSG	Blut-Senkungs-Geschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
CAI	Colitis Activity Index
CDAI	Crohn`s Disease Activity Index
CARD	Caspase recruitment domain protein
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-Reaktives-Protein
CU	Colitis Ulzerosa
ddNTP	Didesoxynucleotid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4,6 Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DNTPS	0,2 μM von jedem Nukleosid-triphosphat
DOTUR	Distance-based OTU and Richness
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EXO I	Exonuclease I
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GCP	Good Clinical Practice
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
ICH	International Conference on Harmonisation
M	Mol

m	milli
MC	Morbus Crohn
min	Minute
ml	Milliliter
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	Nuclear Faktor κB
NOD	Nucleotid-binding oligomerization domaine
OTU	Operational Taxonomical Unit
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PBS	Phosphatbuffered Saline
rRNA	ribosomal Ribonuclic Acid
rpm	Rotationen pro Minute
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SB-Buffer	Sequenzierungs Buffer
SPB	Sodium Phosphate Buffer
SSC	Standard Saline Citrat (0.3M NaCl und 0.3M Natrium Citrat)
Taq	Taq Polymerase
Tab	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galactopyranoside

1. Einleitung

1.1 chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Zu den CED zählen der Morbus Crohn, die Colitis Ulzerosa sowie die indeterminierte Colitis (10% aller CED Patienten) (1). Erstmals beschrieben wurde die Colitis Ulzerosa 1859 von Wilks (2). Der Morbus Crohn wurde 1932 als Krankheitsbild einer regionalen Ileitis von Crohn, Ginzburg und Oppenheimer beschrieben (3). Hauptsymptome der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind Bauchschmerzen, häufige blutige Diarrhoe und ein schweres Krankheitsgefühl. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr.

Bei der Colitis Ulzerosa (CU) handelt es sich um eine chronisch-remittierend verlaufende Entzündung, welche ihren Ausgang im Rektum hat und von dort aus aufsteigt. Sie ist nur auf die Mukosa und Submukosa beschränkt und führt dort zu Ulzerationen. Bei etwa 25% der Patienten dehnt sich die CU über die linke Flexur, in das rechte Hemicolon aus (ausgedehnte Colitis) oder erfasst das gesamte Colon (Pancolitis). Floride Entzündungsphasen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Mukosa gerötet und leicht verletzlich ist sowie Fibrin- und Blutauflagerungen aufweist. Histologisch ist eine ausgeprägte Hyperämie und ein diffus verteiltes und plasmazellreiches Entzündungsinfiltrat sichtbar. Oft sammeln sich in den Kryptenlumina neutrophile Granulozyten in Form von „Kryptenabzessen“ an (4).

Leitsymptom der CU sind blutige Durchfälle. Die Beteiligung des Rektums bewirkt einen ständigen Stuhldrang und eine schmerzhaft Stuhlentleerung (Tenesmen).

Als extraintestinale Manifestation zeigen sich Veränderungen der Haut (Erythema nodosum), Arthropathien überwiegend in Knie- und Sprunggelenk sowie entzündliche Augenveränderungen wie die Episkleritis und Iridozyklitis (5,6). Während des akuten Schubes zeigen sich im Labor unspezifische Entzündungszeichen wie ein erhöhtes CRP und eine Leukozytose (7,8,9) sowie in einigen Fällen eine Anämie (9,10,11,12).

Die Endoskopie des gesamten Kolons mit Intubation des terminalen Ileums und Gewebeentnahme aus terminalem Ileum und Dickdarm ist der Goldstandard in der Diagnosesicherung (13,14,15,16). Die Darmschleimhaut ist in aktiven Krankheitsphasen stark hyperämisch sodass es zu Kontaktblutungen durch das Endoskop kommen kann. Die Darmwandsonographie wird als Screeningmethode und Verlaufskontrolle eingesetzt, ist aber für die Diagnosesicherung aufgrund

fehlender Biopsieentnahmen und geringerer Sensitivität und Spezifität gegenüber den anderen Untersuchungsmethoden ungeeignet (17,18). Die CU ist grundsätzlich durch eine Operation in Form einer Proktokolektomie mit ileoanaler Pouchanlage „heilbar“(19). Die chirurgische Intervention erfolgt bei Patienten mit histologisch gesicherten Dysplasien im Kolon, bei therapierefraktären Krankheitsverläufen, bei Perforationen oder bei einem toxischen Megakolon (20,21,22, 23,24) Nach jahrzehntelangem Krankheitsverlauf besteht die Gefahr einer malignen Entartung zu einem colorektalen Adenocarcinom wobei das Risiko gegenüber der nichterkrankten Normalbevölkerung um 20% erhöht ist (25,26,27,28). Der Morbus Crohn (MC) ist eine chronisch verlaufende, ulzerierende, transmurale Darmentzündung, die prinzipiell von der Mundhöhle bis zum Rektum auftreten kann. Am häufigsten jedoch ist der Befall des terminalen Ileums.

Klinisch präsentiert sich die Erkrankung mit zum Teil schleimigen Diarrhöen und krampfartigen Bauchschmerzen. Allgemeinsymptome sind Gewichtsverlust und Schwäche. Charakteristisch ist eine diskontinuierliche Ausdehnung der ulzerierenden Entzündung innerhalb eines oder mehrerer Darmsegmente. Makroskopisch zeigen sich multiple kleine Ulzera und Ödeme, welche oft ein „Pflastersteinaspekt“ als Darmrelief entstehen lassen. Als typisches histologisches Merkmal finden sich nicht-verkäsende Epitheloidzellgranulome (4). Die Diagnosesicherung erfolgt durch die komplette Coloskopie mit Intubation der Ileozökalklappe und Biopsieentnahme (29). Hierbei zeigt sich eine diskontinuierliche Ausbreitung (Skip Lesions), aphthoide Läsionen, manchmal auch Fisteln oder Stenosen.

Die Darmwandsonographie spielt als Screening und Verlaufskontrolle eine Rolle. Mit der Magnet Resonanz Tomographie (MRT) Untersuchung nach Sellink lassen sich entzündlich Veränderungen, Fisteln und Stenosen im Dünndarmbereich hoch sensitiv darstellen. Mit der MRT lassen sich mittlerweile intestinale und perianale Abszesse erfassen, dies ist aber für die Erfassung der Erstdiagnose wegen niedrigerer Sensitivität und fehlender Biopsieentnahme ungeeignet (30,31,32).

Komplikationen des MC sind Stenosen bis hin zur Ileussyndromatik, des weiteren Strikturen, Fisteln und Abszesse (33,34). Arthralgien, die primär sklerosierende Cholangitis, Osteoporose, Vaskulitiden zählen zu den extraintestinalen Komplikationen (35,36).

Die genaue Ätiologie der CED ist noch ungeklärt (37). Es handelt sich um eine multifaktorielle Genese mit genetischen Hintergrund.

Genetisch zeigt sich bei Patienten mit MC eine Mutation auf dem Chromosom 6q12 (CARD 15) (38). Weiterführende Arbeiten wiesen verschiedene Krankheitsgene für den MC nach: IL23R, ATG16L1, DLG5 und NELL1 (39,40). Diese Mutationen führen zu Mucosaveränderungen und einer veränderten Signaltransduktion in der Darmwandzelle, was eine Barrierefunktionsstörung der Darmschleimhaut hervorruft. Hierbei spielen Interleukine, TNF α und eine Veränderung der Signaltransduktion STAT 1 eine wichtige Rolle (41,42,43,44,45). Dadurch können Bakterien mit dem Darmepithel interagieren und die Darmwand penetrieren, woraufhin eine immunologische Abwehrreaktion gestartet wird, welche zu einer verstärkten Entzündungsreaktion mit einem noch schädigenderen Effekt auf die Darmschleimhaut führt. Die Veränderung der Mukosa hat Einfluss auf die bakterielle Darmflora, so dass es zu einer Reduktion der Diversität kommt (46,47,48,49). Für die pharmakologische Therapie kommen 5-Aminosalicylate, Glucocorticoide, Immunsuppressiva wie z.B. Azathioprin, Biologika wie z.B. TNF α -Antikörper und Probiotika wie z.B. E.coli Nissle 1917 zum Einsatz (50,51,52,53,54).

1.2 Intestinale Mikroflora bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Im menschlichen Darm wurden bisher 365 bakterielle Phylotypen nachgewiesen, wovon 80% zu den unkultivierbaren Bakterien gehören. Die meisten davon gehören zu den firmicuten und bakterioden Phylotypen. Zudem wurde signifikant nachgewiesen, dass es einen Unterschied zwischen der Diversität und der Anzahl der Bakterien, im Vergleich zwischen Darmmukosa und Fäzes gibt (55). Hierbei erweist sich die Analyse über die 16s rRNA als ein präzises und effektives Mittel zur Bestimmung von bakterieller Diversität in komplexen Ökosystemen (56,57).

Klinische Untersuchungen zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Darmflora und der Entstehung von entzündlichen Veränderungen im menschlichen Darmtrakt durch Beeinflussung der Wirt-Immunität besteht (58,59,60). Umweltfaktoren in Kombination mit mehreren genetischen Veränderungen können Auslöser für intestinale Barriestörungen sein (61,62). Das exprimierte NOD2/CARD15 Protein scheint ein zytosolischer Rezeptor für Lipopolysaccharide pathogener Bakterien zu sein. Es ist somit eine entzündliche Antwort auf bakterielle Antigene durch die Aktivierung und Vermittlung von NF κ B (63,64). Um so wichtiger, ist die Suche nach auslösenden pathogenen Bakterien, die für die Verursachung von Barriestörungen verantwortlich sein könnten

(65,66,67,68). Die als Auslöser diskutierten Bakterien wie Bacterioides Arten und E. Coli sind keine Pathogene, aber Kommensale (69,70). Klinische Studien und experimentelle Daten legen nahe, dass die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Schleimhautentzündungen im Gastrointestinaltrakt spielt (58). Dass bei MC und CU Bakterien in der Krankheitsentstehung eine entscheidende Rolle spielen können, zeigt dass z.B. nach Umleitung von Fäzes nach operativer Stoma Anlage mit späterer Rückverlagerung des Darmes am aboralen Teil, bei vorher kompletter Entzündungsfreiheit, ein erneutes Entzündungsgeschehen nachzuweisen (71). Ein weiteres Indiz für den Einfluss von Bakterien auf die Darmwand ist der positive Effekt von Probiotika, z.B. VSL#3, bei der Remissionserhaltung von Patienten mit Pouchitis nach Colektomie mit Ileoanaler Pouchanlage (72,73). Auch die Remission der CU kann durch E. coli Nissle erhalten werden (74,75). Desweiteren konnte eine Abnahme der Bakteriendiversität bei MC um bis zu 50% und bis zu 30% bei CU nachgewiesen werden (76).

1.3 Molekulare Nachweismethode von Bakterien mittels 16S rRNA

Weniger als 1% aller Bakterien sind kultivierbar (77). Das hängt mit den unterschiedlichen Lebensbedingungen der Bakterien zusammen. Diese speziellen Lebensbedingungen, die zum Wachstum gebraucht werden, sind künstlich kaum nachzuahmen. Daher bedient man sich der molekularen „bakteriellen Fingerabdrucktechnik“ über die 16s rRNA. Es handelt sich hierbei um ribosomale RNA, die in Bakterien vorkommt und für die Produktion von Proteinen zuständig ist. Die 16s rRNA zeichnet sich durch eine hohe funktionelle Konsistenz aus und kann zeitliche Variationen zur Aufklärung der Stammesgeschichte, Evolution des Lebens und der Erforschung verwandtschaftlicher Beziehungen unter den Organismen aufzeigen (78). Die gewonnenen Sequenzen können in einem phylogenetischen Baum für die Darstellung verwandtschaftlicher Beziehungen der Arten untereinander aufgetragen werden. Die 16s rRNA wird mittels PCR amplifiziert und damit für weitere Bearbeitung nutzbar gemacht. Die 16s rRNA ist circa 1600 Basenpaare lang, wovon die Hälfte bei allen Bakterien gleich und die andere Hälfte variabel ist (79).

Die 16s rRNA besitzt eine Variabilität von 20-25%. Es wird zur Zeit postuliert, dass Bakterien, deren 16S rRNA-Sequenzen zu 97-98 % übereinstimmen, einer Art zugerechnet werden können. Aktuell sind über 40 verschiedene Bakterieneinheiten anerkannt. Die Darstellung mittels phylogenetischen Baum stellt die verwandtschaftlichen Beziehungen der Arten untereinander dar.

Die Variabilität in den Sequenzen spiegelt die unterschiedlichen physiologischen Lebensumstände der einzelnen Bakterien wieder (77). Durch Amplifizierung und Sequenzierung der RNA-Sequenzen wurde es möglich, kulturunabhängige Analysen durchzuführen (80). Die 16s rRNA stellt heutzutage eine Standardmethode dar, um die Diversität in komplexen Lebensräumen darzustellen (81,82,83,84,85).

1.4 TM 7 Bakteriensubspezies

Durch die Einführung der bakteriellen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden konnte ein neues Verständnis über verschiedene bakterielle Habitate geschaffen werden. Es konnten neue Arten entdeckt werden, die für Entstehungspathologien von Entzündungen eine Rolle spielen könnten.

Die TM7 Bakteriensubspezies ist in den verschiedensten Habitaten auf der Erde zu finden. Diese Bakterienart zählt zu einer nicht kultivierbaren grampositiven Subgruppe. H. Rheims und Mitarbeiter beschrieben 1996 erstmals in der Arbeit „A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment“ TM7-Bakterien. Sie wurden in der mittleren Schicht einer Torfprobe nachgewiesen. Mittlerweile wurde die TM7-Bakteriengruppe in sehr unterschiedlichen Lebensräumen gefunden: im Boden, im Torf, im Grundwasser und in Tiefseesedimenten (86,87,88,89,90). Bei Tieren konnten TM7 Bakterien im Darm von Termiten und in Mäuse-Stuhl nachgewiesen werden.

Beim Menschen konnten TM7 Bakterien in subgingivalen Plaques nachgewiesen werden und zeigten eine Assoziation mit Entzündungen der Mundschleimhaut (91,93). Daher war die Untersuchung der TM7 Bakterien bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen interessant, da es sich ebenfalls um eine Erkrankung der Schleimhaut handelt.

2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der TM7 Bakteriensubspezies bei CED mittels molekulargenetischer Fingerprintanalysen

1. Analyse von Mukosabiopsien von Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa im Vergleich zu Gesunden mittels 16s rRNA Genanalyse
2. Phylogenetische Analyse der TM7 Spezies mit Erstellung von Klonbibliotheken
3. Fluoreszenz in Situ Hybridisierung zum Nachweis von TM7-Bakterien in humanen Mukosabiopsien

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Chemikalien für die RNA Probengewinnung

OB-Protease	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
TL-Puffer	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
PPS	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
SEWS-M	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
DES-Lösung	Q-Biogene, Irvine, CA, USA

Chemikalien für die PCR

nucleasefreies Wasser	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
PCR buffer,	Qiagen, Hilden, Deutschland
Q-Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNTPS	Qiagen, Hilden, Deutschland
TM7 Primer 580 F	Carl Roth GmbH und CO, Karlsruhe
universal Primer 1492 R	Carl Roth GmbH und CO, Karlsruhe

Chemikalien für die Gelelektrophorese und RNA Isolation aus Agarosegel

Sea Kem Le Agarose	Cambrex, Rockland, USA
DNA Ladder 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
TAE Puffer (40mM Tris, 20 mM Zitronensäure, 1mM EDTA, pH 8.3)	BioRad, München, BRD
Loading buffer (Bromophenolblau, Nucleasefreies Wasser, Glycin)	BioRad, München, BRD
Ethidiumbromide	Sigma, Aldrich, BRD

Chemikalien für das klonieren der RNA-Fragmente

nucleasefreies Wasser	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
One Shot Cells	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Ligation Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
PCR 2.1 Vector	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Agar 14g pro Petri Schale	Becton Dickenson, Heidelberg, BRD
Kulturlösung pro Liter: in sterilen dest. Wasser	
Tryptone	Becton Dickenson, Karlsruhe, BRD
Hefeextrakt	Becton Dickenson, Karlsruhe, BRD
NaCl	Merck, Darmstadt, BRD
X-Gal	Sigma, St. Louis, USA
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA

Chemikalien für die Vorbereitung des Sequenzierens

nucleasefreies Wasser	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
PCR buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
M13 F	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
M13 R	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
DNTPS	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland

Chemikalien für das Sequenzieren

SAP	USB Corp, Staufen, BRD
Exo I	USB Corp, Staufen, BRD
nucleasefreies Wasser	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
Big Dye (version 1.1)	Applied, Biosystems, Foster City, CA, USA
Primer (3.2 µM/ml)	Applied, Biosystems, Foster City, CA, USA
SB-Buffer	Applied, Biosystems, Foster City, CA, USA

Chemikalien für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)

DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid 3%	Sigma, Aldrich, BRD
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formamide deionisiertes	Sigma, Aldrich, BRD
Dextran Sulfat 10%	Sigma, Aldrich, BRD
SSC	Sigma, Aldrich, BRD
16s rRNA Oligonucleotid	
Sonde TM7 580 mit Biotin	Thermo Electron, Ulm, BRD
Triton X-100	Sigma, Aldrich, BRD

Geräte, Kits und PC-Programme

ABI PRISM 3700 DNA Analysator	GeneAmp, Foster City, CA, USA
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, BRD
FastPrep Instrument	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Mikroskop	Zeiss, Jena, BRD
Fluoreszenz Mikroskop Filter	Zeiss, Jena, BRD
PCR 2.1 TOPO TA Cloning Kit mit Plasmid Vector PCR 2.1	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Digital Kamerasystem „Axiocam“	Zeiss, Jena, BRD
PCR System 9700	GeneAmp, Foster City, CA, USA
Power Pack Basic	BioRad, München, BRD
Spin Modules	Q-Biogene, Irvine, CA, USA
sterile Zahnstocher	
Subcell, 192 cell	BioRad, München, BRD
Super Frost Glas Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, BRD
Thermowell 96 well plate	Costar®Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Transilluminator	LKB, St. Gabriel, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten und Probengewinnung

Für die Arbeit wurden Mukosabiopsien von 33 gesunden Kontrollpatienten, 42 MC und 31 CU Patienten verwendet. Alle CED-Patienten waren in einem akuten Schub der Erkrankung (Crohn`s Disease Activity Index (CDAI)>150 bei MC, Colitis Activity Index (CAI)>4 bei CU). Die Biopsien stammten von makroskopisch entzündeten Arealen, die nach den Kriterien von Geboes et al (110,111) untersucht wurden. Die Biopsien der Kontrollgruppe stammten aus Coloskopien von Nichterkrankten ohne makroskopische, pathologische oder histologischen Auffälligkeiten. Voraussetzung zur Studienteilnahme war, dass die Probanden in den letzten 6 Monaten vor Entnahme der Biopsien und auch zur Zeit der Biopsieentnahme keine Antibiotika eingenommen hatten. Die Proben wurden bis zur Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Es lagen Einverständniserklärungen der Patienten und ein Votum der Ethikkommission vor. Die Studie wurde nach GCP und ICH Kriterien durchgeführt. Die Studienteilnehmer wurden nach Entnahme des Probenmaterials anonymisiert und die Identität der Studienteilnehmer war nur der Studienleitung bekannt. Um aus den Biopsien die RNA zu gewinnen, wurde nach dem Protokoll FastDNA Spin Kit der Firma Q-Biogene verfahren.

Als erstes wurden die Biopsieproben jeweils mit 25 µl OB-Protease und 200 µl TL-Puffer für 2 h bei 56 °C im Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine kurze Zentrifugierung der Probe und der Transfer in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen, welchen Q-Biogene Lysing Matrix Particles zugesetzt wurden. Ferner wurden die so vorbehandelten Biopsieproben in dem FastPrep-Instrument lysiert. Danach wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Die dabei entstandenen Überstände wurden abpipettiert und in neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gegeben. Hinzugefügt wurde hier noch 250 µl PPS. Dieser Ansatz wurde jeweils 10mal geschüttelt und dann für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die dabei entstandenen Überstände wurden wieder abpipettiert und in neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gegeben, in die anschließend je 1 ml Binding Matrix zugegeben wurde. Nun erfolgte ein vorsichtiges 2 minütiges Schütteln und dann ein Abstellen für einen Zeitraum von 7 Minuten. Die Matrix mit dem restlichen Überstand wurde in Spin Module aufgetragen

und dann für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die hierbei entstandenen Überstände wurden verworfen. Die Filter mit der Matrix wurden mit 500 µl SEWS-M gewaschen und nochmals mit 13000 rpm und einer Dauer von 1 Minute zentrifugiert. Die Überstände wurden wiederum verworfen; die Filterinhalte wurden erneut bei 13000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Filter wurden dann in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße gestellt, wo sie dann für 7 Minuten bei geöffnetem Deckel getrocknet wurden. Daraufhin kamen 100 µl DES-Lösung auf die jeweiligen Filter, um die Elution einzuleiten. Die DES-Lösung wirkte für 30 Minuten bei 4 °C ein. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugieren mit 13000 rpm für 1 Minute. Bei der 2. Elution kam 50 µl DES-Lösung auf den Filter, welche dann für 10 Minuten bei 4 °C einwirkte. Nun erfolgte eine abschließende Zentrifugierung bei 13000 rpm bei einer Dauer von 1 Minute. Die auf diese Weise gewonnenen RNA-Lösungen wurden pro Probe vereinigt und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein wirkungsvolles Verfahren für die direkte Amplifizierung kurzer Genomabschnitte. Voraussetzung ist, dass die Sequenzen an den Rändern der Zielregion bekannt sind. Das Verfahren ermöglicht dann jedoch den Bereich zwischen 2 definierten Stellen zu amplifizieren (94). Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei circa 94 °C. Dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf circa 55 °C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der in massivem Überschuss vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf circa 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei der Primer verlängert wird bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Weil die Kompletierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt. Die Kopienzahl der Zielsequenz steigt theoretisch exponentiell an. In der Praxis verdoppelt sie sich mit jedem Zyklus bis zum Erreichen eines Plateaus, an dem mehr Primer-Matrizen vorhanden sind als das Enzym während eines Zyklus verlängern kann. So ist es möglich, unter optimalen Bedingungen eine bestimmte Sequenz in 25 Zyklen um den Faktor 4×10000000 zu amplifizieren.

Für die PCR der Biopsieproben wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl mit folgender Zusammensetzung gewählt: 35,8 µl nucleasefreies Wasser, 1 µl (ca. 100 ng) extrahierte RNA, 5 µl von 10 x PCR Puffer, 5 µl Q-Solution, 1 µl (0,2 µM) von jedem Desoxyribonukleosid-Triphosphat, 1 µl (0,2 µM) spezifischen TM7 Primer 580F , 1 µl (0,2 µM) universal Primer 1492R (5`GGTTACCTTGTTACGACTT-3`) und 0,2 µl (1 Einheit Taq Polymerase). Zuerst wurden die 1 µl (ca. 100ng) RNA in eine hitzefeste PCR-Platte pipettiert und im Anschluss die restlichen 49 µl zu den PCR-Ansatz hinzugefügt. Die RNA-Amplifikation wurde im GeneAmp PCR System 9700 durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus einem 5 Minuten dauernden Denaturierungsschritt bei 95 °C, mit einem anschließend en 35 mal wiederholenden Zyklus aus 1 Minute bei 95 °C, 1 Minute bei 50 °C, 2 Minuten bei 72 °C, anschließend eine 10 minütlichen Elongationszeit bei 72 °C. Anschließend wurde 1 µl des PCR-Produktes abgenommen und reamplifiziert und zwar mit dem gleichen Protokoll wie vorangehend beschrieben aber lediglich mit 25 Zyklen. Die RNA-Banden mit der korrekten Größe (über 900 bp) wurden aus dem Agarose-Gel extrahiert und purifiziert unter Benutzung des Minelute Gel extraktion Kit der Firma Qiagen. 1 µl der purifizierten RNA wurde unter Benutzung des gleichen PCR-Protokolls nochmals mit 25 Zyklen reamplifiziert und für die Klonierung weiterverwendet.

3.2.3 Gelelektrophorese und RNA Isolation aus Agarosegel

Um den Erfolg einer PCR zu überprüfen und um den Nachweis zu erbringen, dass die richtigen Fragmente amplifiziert worden sind, wurde Agarosegel benutzt.

In dieser Arbeit wurde eine Agarosekonzentration von 1,8 % verwendet, wobei die Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst wurde. Pro Vertiefung im Agarosegel kamen 8 µl des PCR-Produktes auf 5 µl des 5 x Loading-Puffer. Die Elektrophorese wurde mit einer Gleichspannung von 150 V und Dauer von 30 Minuten durchgeführt. Im Anschluss kam das Gel für 20 Minuten in ein Ethidiumbromidbad.

Anschließend wurde das Gel über eine UV-Lampe gelegt, um die einzelnen RNA-Banden mit Hilfe von Ethidiumbromid und Fluoreszenz sichtbar zu machen. RNA-Banden, welche die entsprechende Größe von über 900 bp aufwiesen, sind mit einem sterilen Skalpell extrahiert und in ein beschriftetes 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt worden. Anschließend wurde im Verhältnis 3:1 QG-Buffer

als Gewicht Agarosegel zugegeben und für 10 Minuten bei 50 °C und 50 rpm im Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf inkubiert. Nachdem sich das Agarosegel komplett verflüssigte und die Flüssigkeit eine gelbe Farbe angenommen hatte, wurde pro 100 mg Agarose 100 µl Isopropanol zugefügt. Anschließend wurde maximal 800 µl Probe in eine MinElute-Säule umgefüllt und für 1 Minute bei 13000 rpm in der Centrifuge 5415 R von Eppendorf zentrifugiert. Danach wurden 500 µl QG-Buffer in die Säule zugegeben und noch einmal bei 13000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Der Waschvorgang erfolgte mit 750 µl PE-Buffer, welcher anschliessend erneut 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Das Zentrifugat wurde wieder verworfen und es wurde ohne Zugabe einer Substanz nochmals zentrifugiert. Für die RNA-Bindung wurde die Säule in eine saubere 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäss gestellt und 10 µl EB-Buffer auf das Membran-Zentrum pipettiert und 10 Minuten einwirken lassen. Anschliessend wurde wieder für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und im sauberen 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefässen befanden sich circa 9 µl eluierte RNA, die weiter verwendet werden konnte. Die maximale Bindungskapazität mit diesem Gel Extraction Kit beträgt 5 µg RNA wobei RNA-Längen von 70 - 4000 bp gebunden werden.

3.2.4 Klonieren der DNA Fragmente

Um DNA zu klonieren, sind adäquate Mengen an DNA nötig, die zuvor mittels PCR amplifiziert wurden. Bei der Klonierung werden DNA-Fragmente einer bestimmten Sequenz in einen Vektor, entweder Bakterien-Plasmid oder Phagen, eingefügt. Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können (95). Jeder zum Klonen benutzte Vektor besitzt einen Replikationsstart, ein Selektionsgen (meist ein Antibiotikaresistenzgen) und eine Klonierungsstelle, um fremde DNA in das Plasmid einzuschleusen. Dieser Schritt wird Ligation genannt. Plasmidvektoren haben üblicherweise eine Länge von 2500-5000 Basenpaaren. Die Grösse eines Plasmides ist im Prinzip nicht beschränkt, daher können auch große DNA-Fragmente in einen Plasmidring inseriert werden. Hierbei wird das DNA-Fragment mit Hilfe der T4 DNA Ligase oder der Topoisomerase I in den Vektor integriert. Die Integration erfolgt über

das Aufbrechen des Plasmidringes und der Anlagerung an einen Überstand, welcher meist aus einem Adenosin besteht, so dass auf der Gegenseite ein Thymin gestellt werden muss. Diese Methode wird als TA-Kloning bezeichnet (95). Nach erfolgreicher Ligation muss der Vektor in ein Medium (Bakterien oder Hefepilze) eingebracht werden. In diesen schnell wachsenden Medien werden die DNA-Sequenzen kloniert. Es können 20 bis mehrere Hundert Plasmide in einem Bakterium Platz finden. Die Klonierungsstelle liegt in einem Gen, das bei der Integration des DNA Fragmentes inaktiviert wird. Dadurch sind Selektionen möglich. In dieser Arbeit wurde die „Blau-weiß-Selektion“ verwendet, die auf einer Unterbrechung des LacZ-Gens beruht. Bakterienkolonien, in denen das LacZ-Gen durch die Insertion eines DNA Fragmentes zerstört ist, bleiben nach Inkubation mit Galaktose weiß, während Klone ohne Insertion eines DNA Fragmentes sich blau färben. Zusätzlich enthält der Vektor auch eine Antibiotikaresistenz. Mit dem Antibiotikum wurden Bakterien selektiert, die kein Plasmid enthalten. Das Einfügen eines Plasmides in Zellen bezeichnet man als Transformation (94).

Vor Durchführung der Ligation wurde mittels Agarosegel überprüft, ob die PCR erfolgreich war. Für den Ligations-Ansatz von DNA-Fragmenten wurde pro PCR-Ansatz ein Gesamtvolumen von 10 µl gewählt, das im Einzelnen aus 4µl nucleasefreiem Wasser, 1 µl 10 x Ligationsbuffer, 2 µl PCR 2,1 Vector, 2 µl frisch hergestelltes PCR-Produkt und 1 µl T4-DNA Ligase bestand. Dieser Ansatz wurde über Nacht (mindestens 4 h) bei 14 °C, im Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf inkubiert. Für die Transformation wurde das TA Cloning Kit verwendet.

Pro Ligationsansatz wurden 2 µl abgenommen und mit 50 µl „one shot cells“ vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte der im Wasserbad durchgeführte Hitzeschock bei 42 °C. Hierbei gelangte der Vector in das Bakterium. Gleich nach dem Hitzeschock wurden 250 µl S.O.C.-medium in das 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zugegeben und anschließend für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Als letzter Schritt wurde die Lösung auf einer mit 25 µl X-Gal und 100 µg Ampicilin vorbehandelte Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht in den Inkubator gestellt.

Am nächsten Tag wurden die weißen Kolonien mit sterilen Zahnstochern ausselektiert. Die blauen Kolonien wurden nicht verwertet, da die Ligation bei ihnen ausblieb. Es wurde ausselektiert, indem pro Kolonie ein Zahnstocher Verwendung

find, der anschließend in 500 µl Kulturlösung gestellt wurde und über Nacht bei 100 rpm nochmals inkubiert wurde.

3.2.5 Vorbereitungsschritte für das Sequenzieren

M13 PCR der Klone

Die M 13 Primer sind unspezifisch und binden im Bereich des Vektors und nicht an die DNA des ursprünglich klonierten PCR-Produkts. Damit ist es möglich, die klonierte DNA zu amplifizieren. Als erster Schritt wurden 5 µl von der Bakterienkulturlösung entnommen und bei 95 °C für 10 Minuten lysiert. Danach wurden 36,8 µl nucleasefreies Wasser, 5 µl 10 x PCR Buffer, 1 µl (0,2 µM) Primer M13 F, 1 µl (0,2 µM) Primer M13 R, 1 µl (0,2 µM) von jedem Desoxynukleosid-Triphosphat und 0,2 µl Taq (1 Einheit) Polymerase pro Ansatz hinzugefügt, so dass ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Ansatz entstand. Die PCR-Platte wurde in das GeneAmp PCR System 9700 gestellt und das Programm mit 5 Minuten bei 95 °C gestartet, gefolgt von 35 Zyklen mit je 1 Minute bei 95 °C, 1 Minute bei 53 °C, 2 Minuten bei 72 °C und einem finalen Elongationsschritt bei 72 °C für 10 Minuten.

Digestion

Die Digestion ist eine biochemische Reaktion, bei der DNA-Doppelstränge mit enzymatischer Hilfe geschnitten werden. Dafür wurden 8 µl von der M13 PCR genommen, SAP 0,3 µl, Exo I 0,15 µl, nucleasefreies Wasser 1,55 µl, so dass ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Ansatz vorhanden war. Der Ansatz wurde in das GeneAmp PCR System 9700 gestellt und 15 Minuten bei 37 °C, 15 Minuten bei 72 °C als Digestion- Programm gestartet.

Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung. Hierbei werden die Kettenabbrüche durch den Einbau von Didesoxynukleotiden erzeugt. Die eingebauten ddNTP's besitzen keine 3'-Hydroxygruppe mehr und können nicht mehr in den RNA-Strang eingebaut werden. Die vier unterschiedlichen ddNTP's sind mit

einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, die dann in einer Kapillar-Gelelektrophorese mittels Laser detektiert werden können. Hierfür wurden 1 µl „Big Dye (Vers.1,1)“, 1 µl Primer (3,2 µM), 0,5 µl 5 x SB Buffer, 5,5 µl nucleasefreies Wasser und 2 µl des Digestions-Produktes verwendet, so dass ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Ansatz entstand. Dieser Ansatz wurde in die GeneAmp PCR System 9700 gestellt und mit einer 1 Minute bei 96 °C gestartet. Danach folgten 25 Zyklen mit 10 Sekunden bei 96 °C, 5 Sekunden bei 53 °C, 4 Minuten bei 60 °C. Im Anschluss daran wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Damit war die RNA, für die automatische Sequenzierung im ABI PRISM 3700 DNA Analysator vorbereitet.

3.2.6 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)

Bei der in Situ Hybridisierung wird die RNA, die auf einem Objektträger verteilt und lysierten Zellen denaturiert. Dann wird eine Lösung mit einer markierten RNA-Sonde hinzugefügt. Die Sonde hybridisiert aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen mit den komplementären Sequenzen der denaturierten RNA (94).

Nach dem Waschen verband sich die verbliebene Sonde mit einem Fluorochromgekoppelten Antikörper. Das Ergebnis wird mit einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Das Fluoreszenz-Mikroskop verfügt über spezielle Anregungsfilter, welches den Anregungswellenlängen des Farbstoffes entsprechen. Der für den Nachweis verwendete Fluorochrom markierte Antikörper erscheint später im Fluoreszenz Mikroskop als helles Signal (95). Durch FISH ist es möglich, mit einer 99.99 %igen Spezifität den Nachweis von TM7 in-Vivo zu erbringen.

Bei der in Situ Hybridisierung wurden als erstes die Biopsieproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um sie dann im Kryostaten auf eine Dicke von 6 µm schneiden zu können. Die Gewebedünnschnitte wurden dann auf einen Objektträger verteilt, um sie an der Luft trocknen zu lassen. Zur Inaktivierung der zelleigenen Peroxidase wurden die Dünnschnitte auf dem Objektträger mit 3 %igem Wasserstoffperoxid betropft und bei 37 °C 10 min inkubiert. Nach einem kurzen Eintauchen in 0,01 M PBS erfolgte die Hybridisierung. Dabei wurden 15 µl von einem Gemisch aus deionisierten Formamid, 10 % Dextran Sulfat, 2 x SSC und 5 ng/µl der 16S rRNA TM7 spezifischen Sonde (5' TM7305 5 GTCCCAGTCTGGCTGATC 3'), mit angehängten Biotin auf jedes Gewebestück getropft. Die Objektträger wurden dann in eine abdeckbare Plasikschiene gelegt, die Reste des Hybridisierungsgemisches auf Filterpapier enthielt. Bei 80 °C wurde für 10 min in Wasserbad

erwärmt, so dass die RNA denaturierte wurde und die RNA-Sonde sich an die RNA anlegen konnte. Auf diesen Schritt folgte dann die Inkubation bei 37 °C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger durch ein 5 minütliches Bad in 2 x SSC gewaschen, gefolgt von einem einmaligen Bad in 2 x SSC und 50 % deionisiertem Formamid, worauf der Objektträger wiederholt in 2 x SSC getaucht wurde. Dann erfolgte ein weiteres Bad in 0,1 % Triton X-100 haltigen PBS und einem vorsichtigen Abwaschen in PBS. Die Objektträger wurden dann für 5 min in eine 0,1 % DAPI-Lösung eingelegt, welche lichtdicht verschlossen war. Im Anschluss daran erfolgte die Entfernung von der DAPI-Lösung durch waschen mit nukleasefreiem, destilliertem Wasser. Zum Abschluß wurden die Objektträger mit einer Deckplatte abgedeckt und waren damit fertig, um unter dem unter dem Mikroskop analysiert zu werden. Bei allen Schritten wurde darauf geachtet, eine Lichtkontamination zu vermeiden. Jetzt konnten mit Hilfe einer Mikroskopkamera und einem Computer mit geeigneter Software die Bilder digital gespeichert werden. Die Benutzung eines Filters wurde der an der Sonde angehängten Fluoreszenz-Farbstoff sichtbar gemacht.

3.3 Phylogenetische Analyse

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms CHIMERA-CHECK Algorithmus auf mögliche chimärische Fehler untersucht (96). Das Program arbeitet auf Basis der Ribosomal DatabaseProject (RDP)II Software. Partielle 16s rRNA-Stücke wurden mit anderen Sequenzen aus der Datenbank des RDPII verglichen und die verwandtschaftlichen Verhältnisse bestimmt. Die zueinander bestehenden Verhältnisse wurden mit Hilfe von CLUSTAL X ausgerichtet (97). Abstands und Ähnlichkeitsmatrices wurden mit dem Programm DNADIST unter Berücksichtigung der Jukes-Cantor-Korrektur berechnet. Die phylogenetische Berechnung wurde mit dem Programm „Phylip version 3.64“ durchgeführt. Dieses Programm ist zum Herunterladen <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html> erhältlich unter

3.4 Statistische Analyse

Die Abstands-Matrices, welche vom Programm DNADIST berechnet worden, dienen für weiterführenden statistischen Berechnungen. Für die Rarefaction Analyse, die

Berechnung der Chaol-Schätzfunktion, ACE, des Shannon und des Simpson Index wurde das Computerprogramm „Dotur (Distance-Based OTU and Richness)“ benutzt, welches unter <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html> zugänglich war (98). Mit Hilfe dieses Programms konnte die Unterschiedlichkeit der TM7-Bakteriensubspezies berechnet werden. OTU's wurden in 1 %, 2 % und 3 % Unterschiedlichkeitsstufen berechnet. Um die signifikante Unterschiedlichkeit in der Zusammensetzung zwischen zwei Klonbibliotheken zu berechnen, wurde das Program „Libshuff“ verwendet. Diese Methode beschrieben Singelton et al (99,100). Die Bonferroni-Korrektur wurde benutzt, um den kritischen p-Wert zu berechnen. Die 2 Bibliotheken wurden auf signifikante Unterschiedlichkeiten untersucht. Wenn einer der 2 p-Werte, die von Libshuff errechnet worden sind, gleich oder kleiner zu dem kritischen p-Wert sind, gelten sie als unterschiedlich zueinander. Der kritische p-Wert für 3 Bibliotheken ist 0.0085. Die Abstands-Matrices für die S-Libshuff Analyse sind die gleichen, die für DOTUR verwendet wurden. Die Standard Erfassungseinschätzung wurde errechnet nach der Beschreibung von Good (101), $C = 1 - (n/N)$, wobei n die Anzahl der OTU's ist, die nur einmal in der Bibliothek vorkommt und N die Anzahl der gesamten analysierten Klone ist.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammensetzung der Klonbibliotheken

In dieser Studie wurden die TM7 Bakterien mit Hilfe unterschiedlicher molekularer Techniken im menschlichen Kolon nachgewiesen. In allen Gruppen konnte von über 50 % der Probanden TM7 detektiert werden. Es wurden 235 Sequenzen analysiert. 83 Sequenzen kamen von den MC Patienten, 75 von den Patienten mit CU und 77 von der Nichterkrankten-Kontrollgruppe. Die molekulare 16s rRNA von TM7 konnte bei der MC-Gruppe aus 51,5 % der Biopsieproben RNA-Klone amplifiziert werden, aus der Colitis-Ulzerosa-Gruppe konnte 52,4 % der Biopsieproben RNA-Klone hergestellt werden und aus der Kontrollgruppe konnte von 51,6 % der Biopsieproben RNA-Klone gewonnen werden. Beim Vergleich der einzelnen Klonbibliotheken zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0.01$) zueinander bei einer Unterschiedlichkeitsstufe von 2 % ($D = 0.02$) für beide Krankheitsgruppen (MC und CU) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

4.2 In Situ Hybridisierung

Die in Situ Hybridisierung ist eine Methode, die es ermöglicht Nukleinsäuresequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen mit einer sehr hohen Sensitivität nachzuweisen. In dieser Studie konnte die typische, faserartige morphologische Form von TM7 dargestellt werden. Die hier verwendete Gewebeprobe stammt aus dem Dickdarm. Die Hybridisierung erfolgte mit einer TM7 spezifischen Sonde.

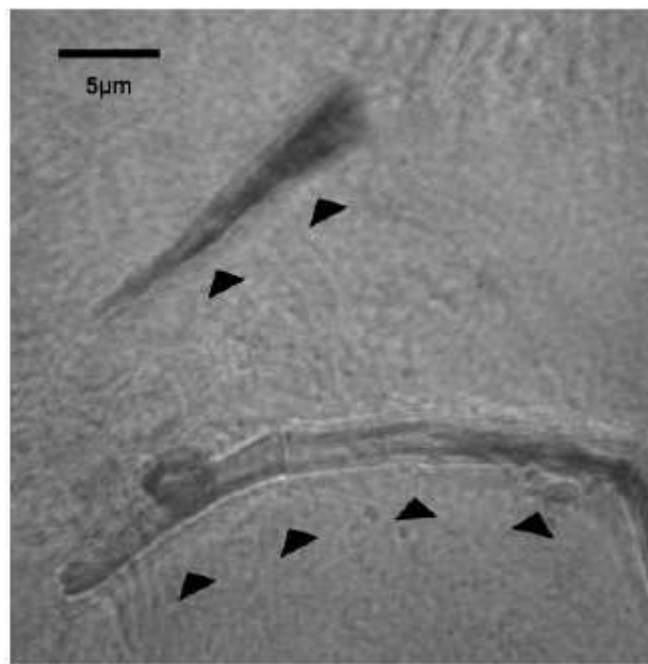


Abb. 1 In situ Hybridisierung von TM7 Bakterien bei einem gesunden Kontrollindividuum. Es zeigt sich das typische morphologische Bild von TM7.

4.3 Phylogenetische Analyse und statistische Indikatoren der Klonbibliotheken

Die Richness und Diversität der TM7 Bakteriensubspezies sind signifikant unterschiedlich zwischen MC-, CU- und der Kontroll-Gruppe. Eine hohe Anzahl an neuen Phylotypen wurde in jeder Gruppe gefunden. Die Definition von neu entdeckten Sequenzen ist: Alle Sequenzen mit weniger als 98 % Übereinstimmung zu einer existierenden Datenbank (n=34 in der MC-Gruppe, n=29 in der CU-Gruppe und n=21 in der Kontroll-Gruppe). Die neu entdeckten Bakteriensequenzen sind in Tabelle 1 mit den Nummern und Beschreibungen dargestellt.

Dichtester Nachbar	Zugangsnummer	Übereinstimmung in %	Anzahl
TM7 phylum sp. oral clone (AF385520)	EU056453	97	7
TM7 phylum sp. oral clone (AF385520)	EU056470	91	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF385520)	EU056377	95	4
TM7 phylum sp. oral clone (AF385520)	EU056486	96	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF385520)	EU056499	94	2
Uncultured bacterium clone (AJ853530)	EU056406	89	6
Uncultured bacterium clone (AJ853530)	EU056403	90	9
Uncultured bacterium clone (AJ853530)	EU056514	88	1
Uncultured soil bacterium clone (AF507686)	EU056494	90	4
Uncultured bacterium Noosa (AF269022)	EU056458	88	2
Uncultured soil bacterium clone (AF507686)	EU056375	88	3
Uncultured soil bacterium clone (AF507686)	EU056419	87	2
Uncultured soil bacterium clone (AF507686)	EU056420	89	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF432141)	EU056500	96	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF432141)	EU056392	97	3
TM7 phylum sp. oral clone (AF432141)	EU056508	95	1
Uncultured bacterium clone (DQ521559)	EU056483	94	1
Uncultured bacterium clone (DQ521559)	EU056400	89	1
Uncultured soil bacterium clone (AF507687)	EU056516	95	1
Uncultured soil bacterium clone (AF507687)	EU056490	92	1
Uncultured bacterium clone (AB200303)	EU056529	96	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF385500)	EU056423	97	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF385500)	EU056416	94	1
TM7 phylum sp. oral clone (AF385500)	EU056527	96	1
Uncultured bacterium (AB195911)	EU056371	93	1
Uncultured bacterium clone (AJ619043)	EU056446	93	1
Uncultured bacterium clone (AM116752)	EU056386	97	1
Uncultured bacterium clone (AM292615)	EU056380	93	1
Uncultured bacterium clone (AB200292)	EU056379	94	1
Candidate division TM7 (AY331416)	EU056454	91	1
Uncultured bacterium clone (AJ583163)	EU056493	95	1
Uncultured bacterium clone (AM116752)	EU056485	97	1
Uncultured bacterium clone (AM116752)	EU056425	93	1
Uncultured bacterium clone (AM116752)	EU056528	96	10
Uncultured soil bacterium clone (DQ248299)	EU056407	97	6

Tab. 1: Neuentdeckte Phylotypen mit weniger als 98 % Übereinstimmung zu einer existierenden Datenbank.

Im direkten Vergleich mit anderen Sequenzen, unter Zuhilfenahme von BLAST (einem Tool in der NCBI Gen Datenbank), zeigten 84 von 221 Klonen weniger als 98 % Übereinstimmung zu derzeit bekannten Datenbankeinträgen und gehören somit zu noch unbekannten Phylotypen. Die Mehrheit der Klonsequenzen zeigten eine enge Verwandtschaft zu oralen Klonen. Nur bei Colitis Ulzerosa Patienten fanden sich Klonsequenzen mit 99 %iger Gleichheit zu dem oralen Bakterien Klon IO25. Dieser Klon ist mutmasslich ein Erreger bei Mundschleimhautentzündungen (93). Das relative Vorkommen unterschiedlicher Phylotypen im Vergleich von Gesunden und Erkrankten ist in Abb. 2 dargestellt.

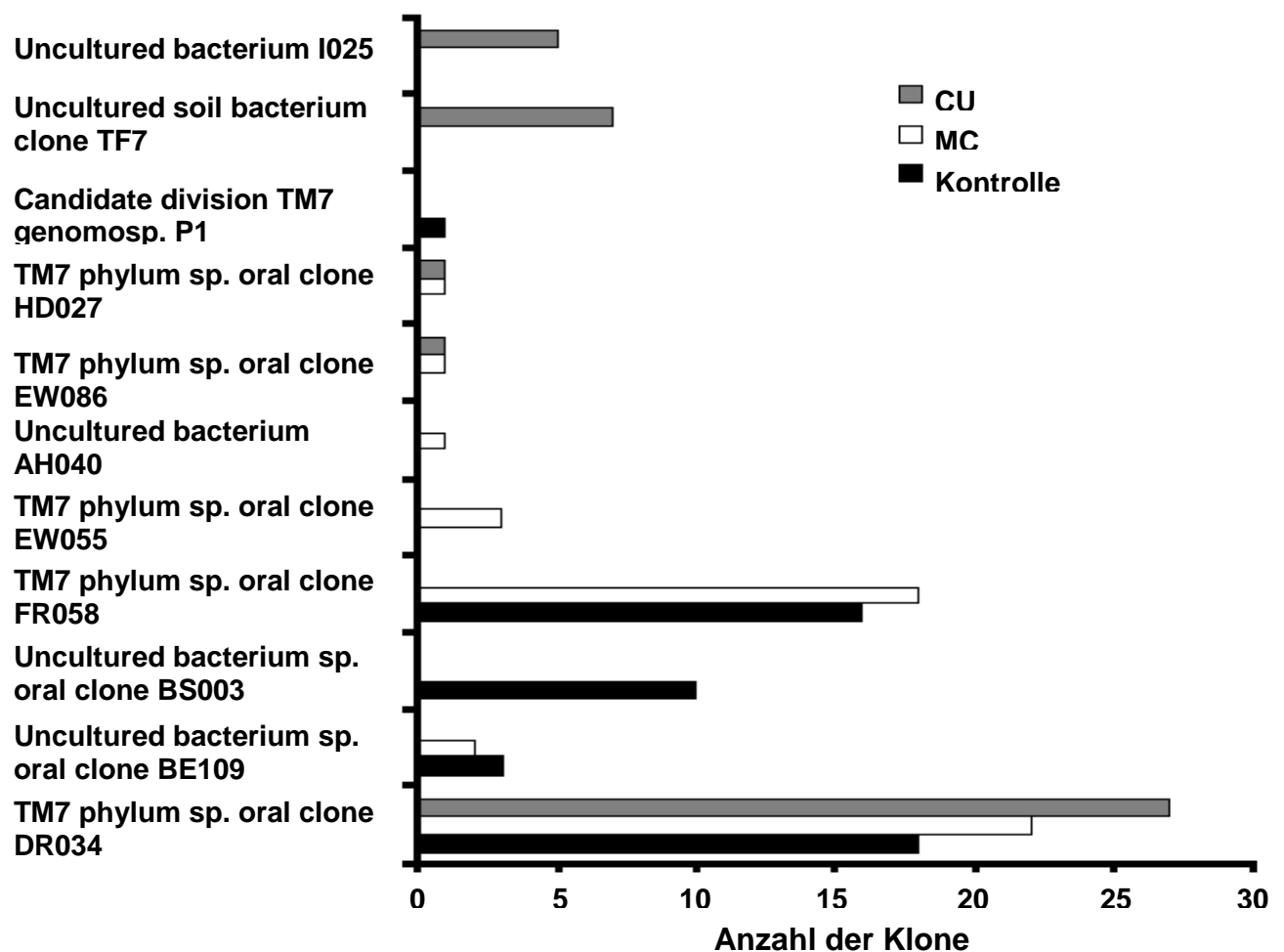


Abb. 2 zeigt die relative Anzahl der unterschiedlichen Phylotypen in Klonbibliotheken von den CED-Gruppen und der Kontroll-Gruppe. Das dichteste verwandtschaftlichste Verhältnis (entsprechend des Datenbank Abgleiches) ist dargestellt im Verhältnis der Klone in den 3 Klonbibliotheken. Der Hauptteil der Klonsequenzen sind eng verwandt mit oralen Klonen. Einige Klone zeigen eine 99 %ige Übereinstimmung mit den oralen Bakterienklon IO25, welches nur in der CU- Gruppe gefunden wurde.

Durch die neuesten Beschreibungen dieser Bakterienuntergruppe ist die Anzahl neuer Phylotypen hoch. Um die Zugehörigkeit der einzelnen Phylotypen darstellen zu können wurde der phylogenetische Baum konstruiert. Hiermit ist es möglich, die einzelnen Klonsequenzen in ihrer genetische Beziehung zueinander grafisch abzubilden. Die Beziehungen zueinander entstanden nach der höchsten Übereinkunft der Sequenzen mit der NCBI Gen Bank. Dieses wird in Abbildung 3 gezeigt

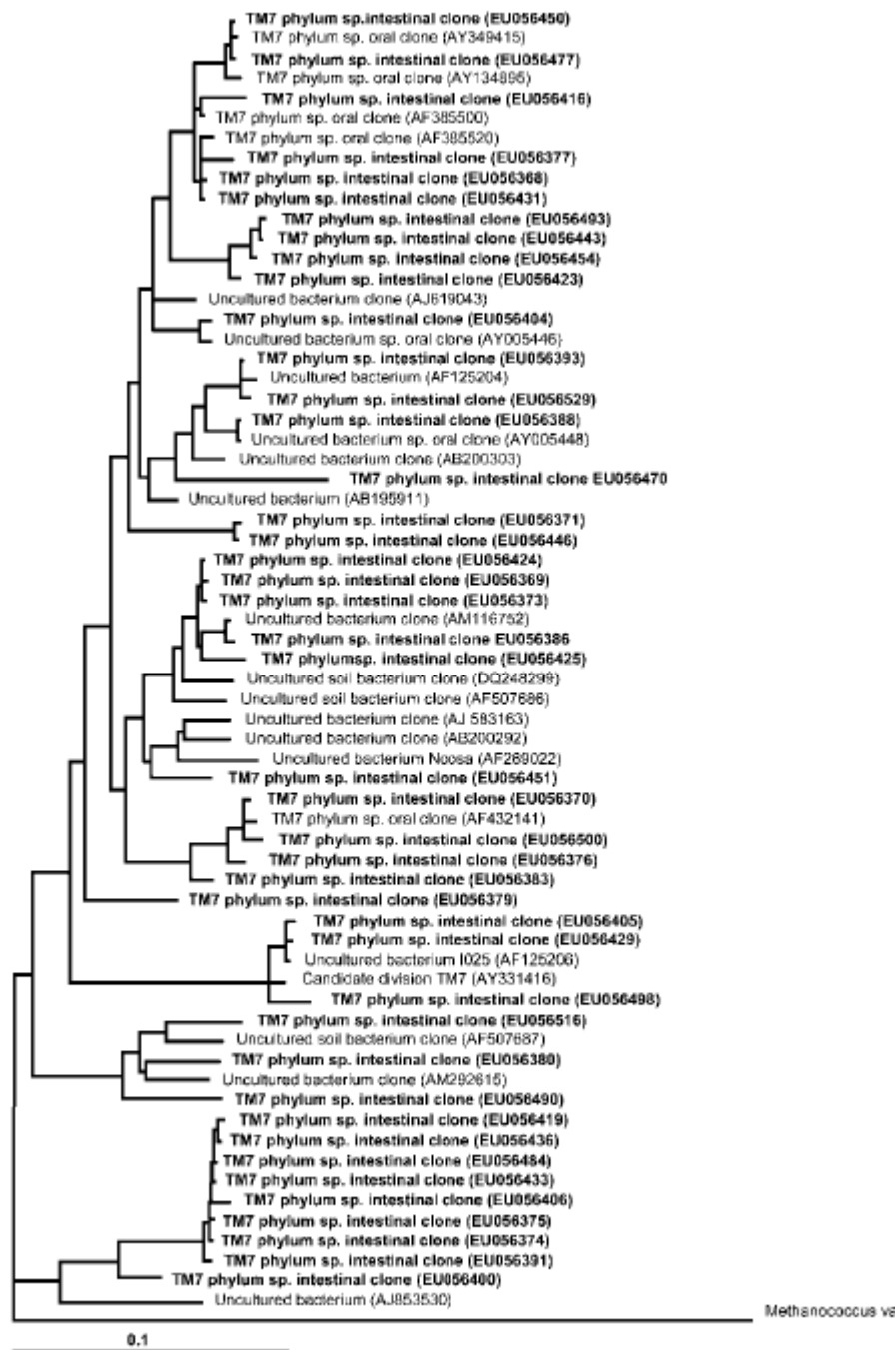


Abb. 3 zeigt den phylogenetischen Stammbaum der verschiedenen OTU's mit ihrer Zugehörigkeit der unterschiedlichen Klone in Bezugnahme der dichtesten verwandtschaftlichen Beziehung, welche in öffentlichen Gen Datenbanken gefunden wurde. Neu entdeckte Klone aus dieser Studie sind fettgedruckt hervorgehoben..

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen, auch bei unterschiedlicher Phylotype Stufe, offenbarte eine höhere Diversität von TM7 in der MC-Gruppe als bei der CU-Gruppe und der Kontroll-Gruppe. Bei einer Unterschiedlichkeitsstufe von mehr als 98 % Gleichheit als Definition eines gleichen Phylotypes konnten in der MC-Gruppe 23 unterschiedliche OTU's detektiert werden, bei der CU-Gruppe jedoch nur 10 und bei der Kontroll-Gruppe waren es 12.

Rarefaction Kurven wurden entworfen, um die Anzahl der OTU's auf der y-Achse mit der Anzahl der nachgewiesenen Sequenzen auf der x-Achse grafisch darzustellen (Abb. 4). Rarefaction Kurven zeigen die Gesamtzahl von gezählten Individuen bei Nachuntersuchung im Vergleich der Gesamtzahl der gefundenen OTU's in dieser Probe. Das Ergebnis ist eine Kurve die initial steil ansteigt und dann gradeuell abfällt. Der Punkt, an dem die Kurve abfällt, ist der Punkt an dem durch zusätzliche Proben keine zusätzliche Information über die Anzahl der OTU's anfällt. Wenn dieser Punkt erreicht ist, wurde die optimalste Probenanzahl gefunden. Unter Benutzung der Formel nach Good wurde die Übereinstimmung jeder Bibliothek berechnet (Tab. 2).

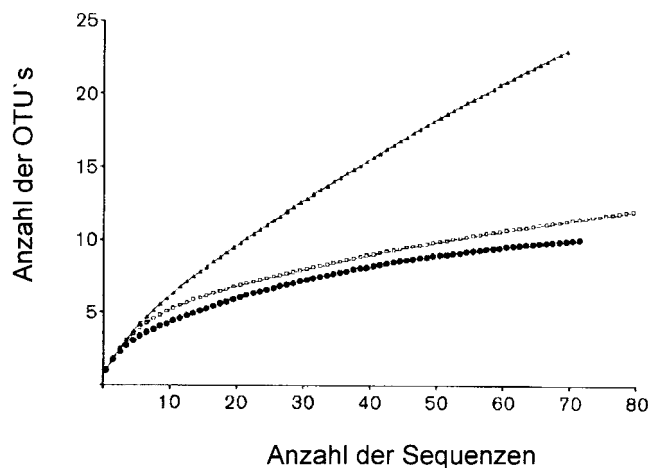
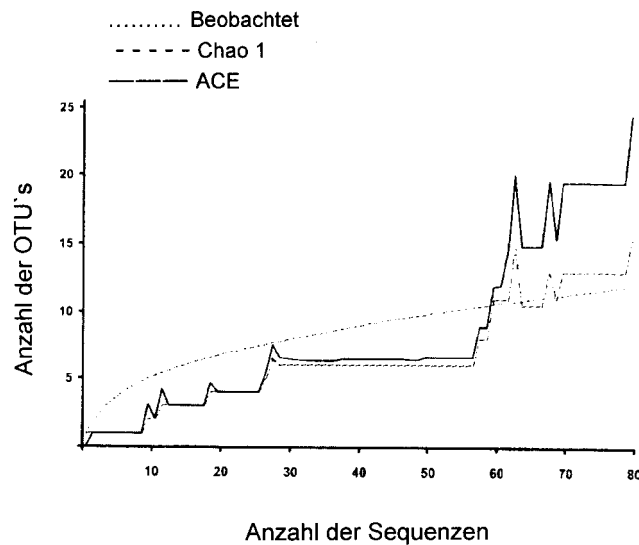


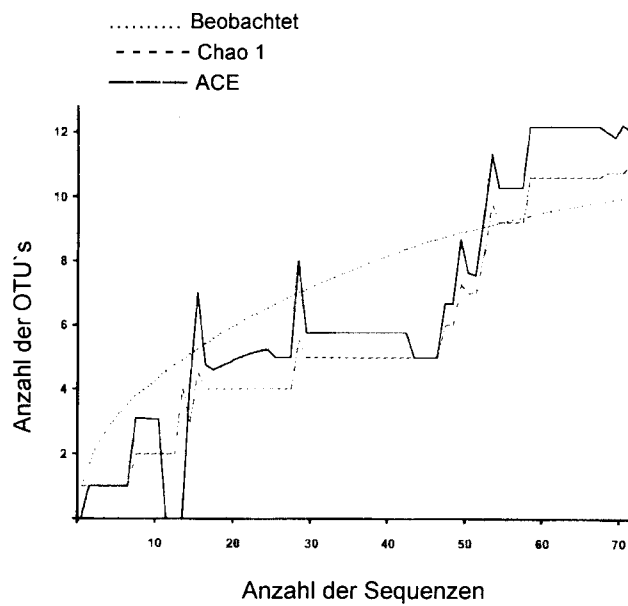
Abb. 4 Rarefaction Kurven die von den 16S rRNA Gen-Klon-Bibliotheken der MC(▲)-, CU(●)- und Kontroll-Gruppe(□) abgeleitet sind. Die Klone wurden eingruppiert in Phylotypen mit einer Stufe von mehr als 98 % Gleichheit (2 % Abstandsstufe). Die Kurven zeigen eine klare Tendenz bezüglich des Erreichen eines Plateaus in ihrer Endphase, ab dem von einer ausreichenden Anzahl an Proben ausgegangen werden kann, um auch selten vorhandene Phylotypen zu identifizieren.

Um die Richness des TM7 Bakteriums in den unterschiedlichen Gruppen zu bestimmen, wurden die nicht-parametrischen Richness Schätzparameter ACE und Chao I verwendet, welche von DOTUR für jede einzelne Bibliothek berechnet und mit den nachgewiesenen OTU`s verglichen wurden. Für die MC-Gruppe wurde mittels Chao I und ACE 47 und 98,70 errechnet, wobei nur 23 OTU`s gefunden wurden (Abb. 5b). Die berechneten Chao I und ACE-Werte in der CU-Gruppe waren 11 und 12,06 , wobei die gefundenen OTU`s bei 10 lagen (Abb. 5c). In der Abbildung 5a zeigt sich der Chao I und der ACE Wert für die Kontroll-Gruppe. Diese waren 15,33 und 24,40 bei 12 nachgewiesenen OTU`s. Die Anzahl der unentdeckten Phylotypen ist dargestellt in der Diskrepanz zwischen nachgewiesenen und geschätzter Anzahl (ACE und Chao I) der OTU`s.

(a)



(b)



(c)

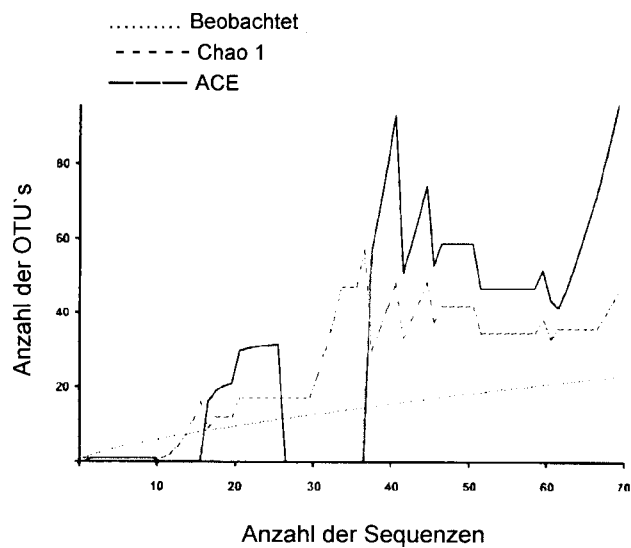


Abb. 5 Collectors Kurven der beobachteten und eingeschätzten Phylotypen-Richness unter der Benutzung der Sequenzen von MC-, CU- und der Kontroll-Gruppe. Die nicht parametrischen Richness Einschätzungen mittels ACE und Chao I wurden mit Hilfe von DOTUR, für jede einzelne Bibliothek und Zusammensetzung der gefundenen OTU's berechnet. Die Abbildung zeigt die Kurven der Kontrolle (a), MC (b) und CU (c).

Der Simpson's Index der Diversity, welcher sowohl die Richness, als auch die Evenness berücksichtigt, wurde als Mass der Diversität benutzt. Dieser Index zeigt im Vorfeld die mikrobiologische Zusammensetzung an (105,106). Es wird vermutet, dass ein Wert für $1/D$ unter 50 ein typisch dominantes Profil aufweist. Demnach ist in allen Bibliotheken eine Dominanz vorhanden. Die Evenness wurde berechnet durch den Shannon-Weaver Index, der auch hier wieder eine Dominanz nachweist (Tabelle 2).

Eckpunkte	MC	CU	Kontrolle
Phylotypes	23	10	12
Singeltons	16	3	5
Chao1 Einschätzung der Spezies Reichhaltigkeit (OTU's)	47	11	15,3
Shannon's Index der Diversität	2,3	1,56	1,85
Simpson's Index der Diversität $1/D$	5,7	3,5	5,1
Evenness	0,54	0,36	0,42
Good's Einschätzung der Coverage in %	77,14	95,83	93,75

Tab. 2: zeigt die statistischen Eckpunkte der einzelnen Klonbibliotheken bei einer Unterschiedlichkeitsstufe von 2 %

4.4 genetisch determinierte Antibiotikaresistenz

Eine atypische Basensubstitution in bakterieller 16s rRNA ist assoziiert mit einer Resistenz gegen das Antibiotika Streptomycin. Ein C auf der Position 912 in dem Konsensus 16s rRNA Gen ist bei den meisten Eubakterien (nicht TM7) mit einer Sensibilität gegenüber Streptomycin verbunden. In Archaeen und TM7 Bakterienspezies ist eine nicht kanonische Substitution von 912 C zu U mit einer Streptomycinresistenz verbunden (86). Bei 34,9 % der Klone von Gesunden konnte ein C an der Position 912 detektiert werden, in Vergleich zu nur 2,7 % der Klone bei der MC-Gruppe und keine bei der CU-Gruppe.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die TM7 Bakteriensubspezies im menschlichen Darm nachweisbar ist. Das Vorhandensein von TM7 bei chronisch entzündeter Mundschleimhaut wurde von verschiedenen Autoren belegt (53,91,92). Hierbei mutmaßte man über entzündungsunterstützende Faktoren von TM7. Die chronische Mundschleimhautentzündung geht auch mit aphtoiden Läsionen einher, wie dies bei Morbus Crohn der Fall ist. Die Rolle von einzelnen Bakterienstämmen (besonders in dichten Ökokomplexen wie im menschlichen Darm) ist bis heute noch unbekannt. Es wird vermutet, dass mehr als 400 unterschiedliche Bakterienarten im Darm zu finden sind (62). In diesem extrem dichten Habitat kann eine kleine Veränderung der verschiedenen Umweltfaktoren zu einer erheblichen Dysbalance zwischen den einzelnen Arten führen. Damit sind veränderte Stoffwechselprozesse und Metabolitenbildung der Bakterien vergesellschaftet. Die Bakterien müssen für ein Gleichgewicht untereinander und mit den Umweltbeschaffenheiten vor Ort sorgen, um das System in Einklang zu halten (102,103,104). TM7 könnte in diesen Zusammenhang, aufgrund der Erkenntnisse über ein verändertes Bakterienmilieu bei der Entstehung der chronischen Mundschleimhautentzündung, auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung der CED spielen. Für die Darstellung der Diversität von Ökosystemen hat sich die 16s rRNA als ein genaues Analysenverfahren gezeigt (59,57). Hiermit war es auch möglich, die Artendiversität aus Mukosabiopsien nachzuweisen und Klonbibliotheken zu entwickeln.

Vorangegangene Veröffentlichungen zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der intestinalen Dysbalance der Bakterien, der Herabsetzung der Diversität und einer veränderten Zusammensetzung bei der Entstehung der CED besteht (76,84,107,108). Diese Veränderungen verursachen einen elementaren Wechsel der lokalen Bedingungen, so dass ein Selektionsdruck auf die sensiblen Bakterien entsteht. Veränderte Wachstumsbedingungen und ein damit verringerter Selektionsdruck könnten eine Erklärung für das breitere Spektrum und dem Vorkommen von neuen Phylotypen von TM7 sein, wie es bei Patienten mit CED im Vergleich zur Nicht-Erkrankten Kontrollgruppe der Fall ist. TM7 scheint nicht direkt für Entzündungen zuständig zu sein, aber die lokalen mikrobiotischen Bedingungen so zu verändern, dass ein pro-inflammatorisches Milieu entsteht (93). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass bei chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen ein bakterielles Ungleichgewicht auftritt. Die entzündungsauslösenden Faktoren sind aber bei den beiden Hauptkrankheitsgruppen (CU und MC) unterschiedlich. Aufgrund der Tatsache, dass TM7 nicht kultivierbar ist und nur eine metagenomische Analyse vorhanden ist, werden mehr Informationen über den Metabolismus von TM7-Bakterien benötigt, um die Relevanz in der Pathogenese bei CED besser einordnen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Basensubstitution der 16s rRNA in der MC-Gruppe nachgewiesen werden. Ein C auf der Position 912 der 16s rRNA ist verantwortlich für die Sensitivität der meisten Bakterien, ausser für TM7 zu Streptomycin. Ein Basenaustausch (G U auf Position 912) ist assoziiert mit einer Antibiotikaresistenz gegenüber Streptomycin (86). Aminoglykoside binden an einer kleinen Untereinheit des bakteriellen Ribosom der 16S rRNA. Diese Bindung ist bei Archaeen, Bakterien und Eukaryoten vorhanden, so dass eine Basenveränderung in der Codierung der 16S rRNA eine Resistenz gegen Aminoglykoside hervorrufen kann (109).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Vorhandensein von TM7-Bakterien im menschlichen Kolon gezeigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TM7 bei Patienten mit CED in veränderter Diversität, im Vergleich zu einer Nicht-Erkrankten-Kontrollgruppe nachweisbar sind. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Studien von TM7, die besagen dass sie als Auslöser für pro-inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Dies besonders bei chronisch entzündlichen gastrointestinalen Erkrankungen, bei denen mehrere Faktoren als Auslöser mitbeteiligt sind. Ausserdem konnten in dieser Arbeit neue Phylotypen von TM7 bei CED nachgewiesen werden, die eine Resistenz zu dem Antibiotika Streptomycin aufweisen. Diese vorliegenden Fakten weisen darauf hin, dass spezifische Bakterienpopulationen die intestinale Mikroflora beeinflussen und so eine mögliche Rolle im Pathogeneseprozess der CED spielen. Um dieses Rolle weiter zu bestimmen, benötigt es weiterführende metagenomische Untersuchungen, um herauszufinden, ob TM7 einen direkten entzündlichen Einfluss ausüben oder über eine Umgestaltung der vorhandenen intestinalen Wachstumsbedingungen wirksam sind.

6 Zusammenfassung

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen manifestieren sich als chronische, schubweise rezidivierende Entzündung des humanen Gastrointestinaltraktes, deren Ätiologie jedoch noch nicht gänzlich gesichert ist. Neben Umwelt und genetischen Faktoren werden Mikroorganismen bei der Entstehung von Barrierestörungen mit chronischer Entzündung diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auch die vor kurzem entdeckten, unkultivierbaren TM7 Bakteriensubspezies im Kolon nachweisbar ist. TM7 steht in Verdacht, ein Auslöser für chronische Entzündungen der Mundschleimhaut zu sein.

Es wurden Mukosabiopsien von Patienten mit Morbus Crohn, mit Colitis Ulzerosa und von Kontrollindividuen mittels molekulargenetischen Methoden basierend auf der 16S rRNA Genanalyse untersucht. Klonbibliotheken wurden erstellt. Die Diversität von TM7 wurde untersucht und TM7-Bakteriensubspezies wurden mittels in Situ Hybridisierung dargestellt.

Die taxonomische Analyse der Sequenzen wies eine höhere Diversität der TM7 Phylotypen bei Morbus Crohn als bei Colitis Ulzerosa oder gesunden Kontrollpatienten nach. Alle Klonbibliotheken zeigten eine grosse Anzahl neuer Sequenzen. Eine atypische Basensubstitution der 16S rRNA, welche assoziiert ist mit einer Antibiotikaresistenz gegen Streptomycin, konnte nachgewiesen werden. Die Alteration der TM7 Bakteriensubspezies und die genetisch determinierte Antibiotikaresistenz der TM7 Bakteriensubspezies bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen könnten ein wichtiger Punkt bei der Alterierung der bakteriellen Mikroflora z.B. als Promoter für Entzündungen darstellen.

Die TM7 Bakteriensubspezies könnte ein wichtiger Bestandteil im Pathogeneseprozess der chronisch entzündliche Darmerkrankungen darstellen, ähnlich wie bei chronischen Entzündungen der Mundschleimhaut.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Classen, Diehl, Cochsiek, 2004, Innere Medizin, Urban und Fischer
- (2) Kirsner JB, 1988, Historical aspects of inflammatory bowel disease, J Clin Gastroenterol;10(3):286-97
- (3) Crohn BB, Ginzburg C, Oppenheimer JD, 1932, Regional ileitis: a pathological and clinical entity, JAMA 99: 1323-29
- (4) Ride, Werner, Schäfer, 2004, Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme Verlag
- (5) Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR, 2006, Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases, World J Gastroenterol 14;12(30):4819-31.
- (6) Mintz R, Feller ER, Bahr RL, Shah SA, 2004, Ocular manifestations of inflammatory bowel disease, Inflamm Bowel Dis. ;10(2):135-9
- (7) Abdolvahab-Emminger, 1998, Exaplan, Urban und Fischer Verlag
- (8) Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P, 2006, Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?, Gut;55(3):426-31
- (9) Vijverman A, Piront P, Belaiche J, Louis E, 2006, Evolution of the prevalence and characteristics of anemia in inflammatory bowel diseases between 1993 and 2003, Acta Gastroenterol Belg.;69(1):1-4
- (10) Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S, 2006, Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients, Inflamm Bowel Dis.;12(2):123-30
- (11) Vijverman A, Belaiche J, Louis E, 2005, Chronic anemia in inflammatory bowel diseases: review, Rev Med Liege.;60(11):888-92
- (12) Udvardy M, Altorjay I, Palatka K, 2001, Hematologic aspects of inflammatory bowel diseases, Orv Hetil.;142(17):883-6
- (13) Stange EF, Riemann J, von Herby A, Lochs H, Fleig WE, Schömerich J, Kruis W, Parschen R, Bruch HP, Zeitl M, Schreiber S, Moser J, Matthes H, Selbmann HK, Goebell H, Caspary WF, 2001, Therapie der Colitis Ulcerosa-Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsenzkonferenz der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Z. Gastroenterol. 39: 19-72
- (14) Hommes DW, van Deventer SJ, 2004, Endoscopy in inflammatory bowel diseases, Gastroenterology;126(6):1561-73
- (15) Danese S, Motte Cd Cde L, Fiocchi C, 2004, Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications, Am J Gastroenterol; 99(5):938-45
- (16) Lee SD, Cohen RD, 2002, Endoscopy in inflammatory bowel disease, Gastroenterol Clin North Am.;31(1):119-32.
- (17) Bremner AR, Griffiths M, Argent JD, Fairhurst JJ, Beattie RM, 2006, Sonographic evaluation of inflammatory bowel disease: a prospective, blinded, comparative study, Pediatr Radiol. ;36(9):947-53
- (18) Mayer D, Reinshagen M, Mason RA, Muche R, von Tirpitz C, Eckelt D, Adler G, Beckh K, Kratzer W, 2000, Sonographic measurement of thickened bowel wall segments as a quantitative parameter for activity in inflammatory bowel disease, Z Gastroenterol.;38(4):295-300.
- (19) Hancock L, Windsor AC, Mortensen NJ, 2006, Inflammatory bowel disease: the view of the surgeon, Colorectal Dis.;8 Suppl 1:10-4
- (20) Kim KH, Lichtenstein GR, 2004, Refractory Inflammatory Bowel Disease, Curr Treat Options Gastroenterol.;7(3):201-211
- (21) Lebreton G, Fatome A, 2003, Management of severe acute colitis, J Chir (Paris).;140(4):201-10
- (22) Vendrell R, Inesta M, Mera R, Iturrino J, Soto A, Mas M, Lojo JJ, Torres EA, 2001, Ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis: the University of Puerto Rico experience, P R Health Sci J.;20(3):221-4
- (23) Bortlik M, Lukas M, 2001, Toxic megacolon, Cas Lek Cesk ;140(20):619-23
- (24) Pascu M, Muller AR, Wiedenmann B, Dignass AU, 2003, Rescue therapy with tacrolimus in a patient with toxic megacolon, Int J Colorectal Dis.;18(3):271-5.

- (25) Stewenius J, Adnerhill I, Anderson H, Ekelung JR, Floren Ch, Fork FT, Janzan L, Lindstrom L, Ogren M, 1995, Incidence of Colorectal Cancer and all cause mortality in non-selected patient with ulcerativ colitis and indeterminate colitis, 1995, *Int J Colorectal Dis* 10:117-22
- (26) Delaunoy T, Limburg PJ, Goldberg RM, Lymp JF, Loftus EV Jr., 2006, Colorectal cancer prognosis among patients with inflammatory bowel disease, *Clin Gastroenterol Hepatol.*;4(3):335-42
- (27) Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, Fischer S, Vargha P, Lakatos PL, 2006, Risk factors for ulcerative colitis associated colorectal cancers in a Hungarian cohort of ulcerative colitis patients, *Orv Hetil.*;147(4):175-81.
- (28) Vieth M, Tannapfel A, 2006, New pieces of the pathogenetic mosaic in inflammatory bowel disease, *Eur J Gastroenterol Hepatol.*;18(2):123-4
- (29) Stange EF, Schreiber S, Fölsch UR, van Herbay A, Schömerich J, Hoffmann J, Zeitz M, Fleig WE, Buler HJ, Kroesen AJ, Moser J, Matthes H, Adler J, Reinshagen M, Stein J, 2003, Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn, *Z. Gastroenterology*, 41: 19-68
- (30) Borthne AS, Abdelnoor M, Rugtveit J, Perminow G, Reiser T, Klow NE, 2006, Bowel magnetic resonance imaging of pediatric patients with oral mannitol MRI compared to endoscopy and intestinal ultrasound, *Eur Radiol.*;16(1):207-14
- (31) Schreyer AG, Rath HC, Kikinis R, Volk M, Scholmerich J, Feuerbach S, Rogler G, Seitz J, Herfarth H, 2005, Comparison of magnetic resonance imaging colonography with conventional colonoscopy for the assessment of intestinal inflammation in patients with inflammatory bowel disease: a feasibility study, *Gut.*;54(2):250-6
- (32) Albert J, Scheidt T, Basler B, Pahle U, Schilling D, Layer G, Riemann JF, Adamek HE, 2002, Magnetic Resonance Imaging in diagnosis and follow-up of Crohn's Disease--Is conventional enteroclysis still necessary?, *Z Gastroenterol.*;40(9):789-94
- (33) Lee H, Kim YH, Kim J, Chang DK, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Paik SW, Rhee JC, 2006, Nonsurgical treatment of abdominal or pelvic abscess in consecutive patients with Crohn's disease, *Dig Liver Dis.*;38(9):659-64
- (34) Scholmerich J, 2005, Complications of chronic inflammatory bowel disorders: treatment, *Schweiz Rundsch Med Prax.*;94(43):1671-9
- (35) Mendoza JL, Lana R, Taxonera C, Alba C, Izquierdo S, Diaz-Rubio M, 2005, Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: differences between Crohn's disease and ulcerative colitis, *Med Clin (Barc)*;125(8):297-300
- (36) Loftus EV Jr., 2004, Management of extraintestinal manifestations and other complications of inflammatory bowel disease, *Curr Gastroenterol Rep.*;6(6):506-13.
- (37) Probert CS, Jayanthi V, Ramptor DS, Mayberry J, 1996, Epidemiologie of inflammatory bowel disease in different ethnic and religious groups: limitation an aetiological dues, *Int J. Colorectal Dis.*, 11: 25-28
- (38) Hampe J, Shaw S, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S, 1999, Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p, *Human Genetic*;65:1647-1655
- (39) Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S, 2002, Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study, *Lancet*;359:1661-5
- (40) Franke A, Hampe J, Rosenstiel P, Becker C, Wagner F, Häslér R, Little R, Huse K, Ruether A, Balschun T, Wittig M, ElSharawy A, Mayr G, Albrecht M, Prescott N, Onnie C, Fournier H, Keith T, Radelof U, Platzer M, Mathew C, Monika Stoll M, Michael Krawczak M, Nürnberg P, Schreiber S, 2007, Systematic Association Mapping Identifies NELL1 as a Novel IBD Disease Gene, *PLoS ONE* 2(8): e691
- (41) Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S, 1998, Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation, *Gut*; 42(4):470-6
- (42) Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kuhbacher T, Hamling J, Fölsch UR, Seegert D, 2002, Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease *Gut*;51(3):379-85

- (43) Seegert D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S, 2001, Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease, *Gut*;48(3):326-32.
- (44) Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hamling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A, 1999, Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease, *Lancet*;353(9151):459-61
- (45) Lochs H, Adler G, Beglinger C, Duchmann R, Emmrich J, Ewe K, Gangl A, Gasche C, Hahn E, Hoffmann P, Kaskas B, Malchow H, Pohl C, Raedler A, Renner E, Scholmerich J, Schreiber S, Stange E, Tilg H, Vogelsang H, Weigert N, Zeitz M, 1999, Anti-TNF antibody in Crohn's disease--status of information, comments and recommendations of an international working group, *Z Gastroenterol.*;37(6):509-12
- (46) Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H., 2002, Mucosal flora in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*;122:44-54
- (47) Zhang L, Mitchell H, 2006, The roles of mucus-associated bacteria in inflammatory bowel disease, *Drugs Today (Barc)*;42(9):605-16
- (48) Ewaschuk JB, Dieleman LA, 2006, Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases, *World J Gastroenterol*;12(37):5941-50
- (49) Perencevich M, Burakoff R, 2006, Use of antibiotics in the treatment of inflammatory bowel disease, *Inflamm Bowel Dis*;12(7):651-64
- (50) Wehling, 2005, klinische Pharmakologie, Thieme Verlag
- (51) Baert F, Noman M, Vermeire S, van Asche G, Haens J, Carbonez A, Rutgeerts P, 2003, Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in crohn's disease, *N Engl. J Med.* 348:601-8
- (52) Rutgeerts P, D'Haens J, Targan S, Vasilias E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hagezand RA, Brookman T, De-Woody KL, Schaible TF, van Deventer SJ, 1999, Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in crohn's disease, *Gastroenterology* 117:761-9
- (53) Myrelid P, Svarm S, Andersson P, Almer S, Bodemar G, Olaison G, 2006, Azathioprine as a postoperative prophylaxis reduces symptoms in aggressive Crohn's disease, *Scand J Gastroenterol.*;41(10):1190-5
- (54) Holtmann MH, Krummenauer F, Claas C, Kremeyer K, Lorenz D, Rainer O, Vogel I, Bocker U, Bohm S, Buning C, Duchmann R, Gerken G, Herfarth H, Luger N, Kruis W, Reinshagen M, Schmidt J, Stallmach A, Stein J, Sturm A, Galle PR, Hommes DW, D'Haens G, Rutgeerts P, Neurath MF, 2006, Long-term effectiveness of azathioprine in IBD beyond 4 years: a European multicenter study in 1176 patients, *Dig Dis Sci.*;51(9):1516-24
- (55) Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA, 2005, Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science*;308:1635-1638
- (56) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol Rev*; 59(1):143-69
- (57) Pace NR, 1997, A molecular view of microbial diversity and the biosphere, *Science*; 276(5313):734-40
- (58) Sartor RB, Rath HC, Sellon RK, 1996, Microbial factors in chronic intestinal inflammation, *Curr. Opin Gastroenterol.*, 12:327-33
- (59) Hooper LV, Wang MH, Thelin A, Hannsson L, Falk PJ, Gordon JL, 2001, Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine, *Science*; 291(5505):881-4
- (60) Hooper LV, Gordon JL, 2001, Commensal host-bacterial relationships in the gut, *Science*; 292(5519):1115-8
- (61) Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M, 2005, Genetic of crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease, *Nat. Rev. Genet.*; 6:376-88
- (62) Eckburg PB, Relman DA, 2007, The role of microbes in crohn's disease, *Clin. Infect Dis.*; 44:256-62
- (63) Shanahan F, 2002, Crohn's disease, *Lancet*;359(9300):62-9

- (64) Guarner F, Malagelada JR, 2003, Role of bacteria in experimental colitis, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*;17(5):793-804.
- (65) Liu Y, Kruiningen HJ, West AB, Cartum RW, Cartot A, Colombel JF, 1995, Immunocytochemical evidence of listeria, escheria coli and streptococcus antigens in crohn`s disease, *Gastroenterology*; 108(5): 1396-404
- (66) Chiodini RJ, van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WK, Coutu JA, 1984, Characteristics of an unclassified mycobacterium spezie isolated from patients with crohn`s disease, *J Clin Microbiol.*;20(5):966-71
- (67) McOrist S, Jasni S, Macki RA, MacIntyre N, Neef N, Lawson GH, 1993, Reproductive of porcine proliferative enteropathy with pure culture of ileal symbiont intracellularis, *Infect Immun*; 61(10):4286-92
- (68) Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O`Sullivan GC, O`Connell J, Shanahan F, 2002, Per detection of mycobacterium paratuberculosis in crohn`s disease granulomas isolatet by laser capture microdissection, *GUT*; 51(5):665-70
- (69) Waidmann M, Allemand Y, Lehmann J, di Genaro S, Bücheler N, Hamann A, Autenrieth IB, 2002, Microflora reactive IL-10 producing regulatory T cells are present in the colon of IL-2 deficient mice but lack efficacious inhibition of IFN-gamma and TNF-alpha production, *Gut*;50(2):170-9
- (70) Rath HC, Wilson KH, Sartor RB, 1999, Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*, *Infect Immun*;67(6):2969-74
- (71) Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Klessen B, Gianchetti P, Blaut M, Campieri M, Fölsch UR, Kamm MA, Schreiber S, 2006, Bacterial and fungal microbionics in the relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis, *GUT*; 55(6): 833-41
- (72) Liu Y, Kruiningen HJ, West AB, Cartum RW, Cartot A, Colombel JF, 1995, Immunocytochemical evidence of listeria, escheria coli and streptococcus antigens in crohn`s disease, *Gastroenterology*; 108(5): 1396-404
- (73) Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Mateuzi C, Bazzocchi G, Roggioli G, Miglioli M, Campieri M, 2000, Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo controlled trial, *Gastroenterology*; 119:305-9
- (74) Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR, 1999, Non-pathogenic escheria coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial, *Lancet*; 119:305-9
- (75) Kruis W, Frie P, Stolte M, 2001, The mufalor study group: Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with escheria coli nissle 1917 and with standard mesalamine, *Gasroenterology*; 120:a127
- (76) Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S., 2004, Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacteria microflora in patient with active inflammatory bowel disease, *GUT*; 53:685-693
- (77) Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR, 1998, Impact of the culture-independent studies on the emerging pylogenetic view of bacterial diversity, *Journal of Bacteriology*; 18:4765-4774
- (78) Woese CR, 1987, bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51/2: 221-71
- (79) Woese CR, Winker S, Gutell RR, 1990, Architectur of ribosomal RNA: constraintion the sequence of tetra-loops, *Proc. Nat. Acad of science* 87: 8467-8471
- (80) Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR, 1991, Analysis of a marine picoplankton community by 16s rRNA gene cloning and sequencing, *J. Bacteriol.* 173/14: 4371-8
- (81) Zeng D, Ahn EW, Stahl DAA, Raskin C, 1996, caractisation of universal spol-subunit rRNA hybridisation probes for quantitative molekular microbial ecology studies, *Appl. Envirom. Microb.* 62(12):4504-13
- (82) Zoetendal EG, Akkermans AD, de Vos WM, 1998, Temperature gradient gel electrophoresis analysis for 16s rDNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*;64(10):3854-9
- (83) Zoetendal EG, van Wright A, Vilponem-Salmeda T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM, 2002, Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributet alon the colon and difter from the community recovered from feces, *Appl. Environ. Microbiol.*; 68(7) 3401-7
- (84) Seksik P, Rigoitier-Gois L, Gramert G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore G, 2003, Alternations of the dominant faecl bacterial groups in patients with crohn`s disease of the colon, *GUT*; 52(2):237-42

- (85) Tannock GW, 2002, The bifidobacterial and lactobacillus microflora of the humans, *Clin Rev. Allergy Immunol.*; 22(3):231-53
- (86) Hugenholtz P, Tyson GW, Webb RI, Wagner AM, Blackall LL., 2001, Investigation of candidate TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure culture representatives, *Applied Environmental Microbiology*;67:411-419
- (87) Ariesyady HD, Ito T, Okabe S, 2007, Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester, *Water Res.*;41(7):1554-68
- (88) Lahtinen T, Kosonen M, Tirola M, Vuento M, Oker-Blom C, 2006, Diversity of bacteria contaminating paper machines, *J Ind Microbiol Biotechnol.*;33(9):734-40
- (89) Donachie SP, Hou S, Lee KS, Riley CW, Pikina A, Belisle C, Kempe S, Gregory TS, Bossuyt A, Boerema J, Liu J, Freitas TA, Malahoff A, Alam M, 2004, The Hawaiian Archipelago: a microbial diversity hotspot, *Microb Ecol.*;48(4):509-20
- (90) Lefebvre O, Vasudevan N, Thanasekaran K, Moletta R, Godon JJ, 2006, Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries, *Extremophiles*;10(6):505-13
- (91) Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moenchberger MC, Leyes EJ, 2003, New bacterial species associated with chronic periodontitis, *J Dent. Res.*, 82:338-44
- (92) Ouverny CC, Armitage GC, Relman DA, 2003, Single-cell enumeration of an uncultivated TM7 subgroup in the human subgingival crevice, *Appl. Environmental Microbiol.* 69: 6294-8
- (93) Brinig MM, Lepp PW, Ouverney CC, Armitage GC, Relman DA., 2003, Prevalence of Bacteria of Division TM7 in Human subgingival Plaque and their association with disease, *Applied and Environmental Microbiology*;1687-1694
- (94) Lewin, 2002, *Molekularbiologie der Gene*, Spektrum Wissenschaftsverlag GmbH Heidelberg Berlin
- (95) Mühlhardt, 2002, *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 3.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin
- (96) Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S, McGarrell DM, Schmidt TM, Garrity GM, Tiedje JM; Ribosomal Database Project., 2003, The Ribosomal Database Project (RDP II) Previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy, *Nucleotides Acids Research*;31:442-3
- (97) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997, The clustal_X windows interface:flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*;25:4876-4882
- (98) Schloss P. und Handelsman J., 2005, Introducing Dotur, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness, *Applied and Environmental Microbiology*;71:1501-1506
- (99) Singleton DR, Furlong MA, Rathbun SL, Whitman WB, 2001, Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology*;67:4374-4376
- (100) Schloss PD, Iargat BR, Handelsman J, 2004, Integration of Microbial ecology and statistics: a Test to compare gene libraries *Appl. Environ. Microbiol.*; 70:5485-92
- (101) Good IJ, 1953, The population frequencies of species and the estimation of the population parameters, *Biometrika*; 237-264
- (102) Sansonetti, 2004, War and Peace at the mucosal surfaces, *Nat Rev Immunol*; 4:953-64
- (103) Bassler BL, 1999, How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr Opin Microbiol*; 2:582-7
- (104) Mai V, Morris JG, 2004, Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age, *J Nutr*; 134:459-64
- (105) Katouli M, Bark T, Ljungqvist O, Svenberg T, Mollby R, 1994, Composition and diversity of intestinal coliform flora influence bacterial translocation in rats after hemorrhagic stress, *Infect Immun* 62, 4768-74

- (106) Zhou J, Xia B, Treves D, Wu L, Marsh T, O'Neill R, Palumbo A, Tiedje J, 2002, Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil, *Appl Environ Microbiol* 68, 326-34
- (107) Marteau P., 2000, Role of the intestinal flora in gastrointestinal diseases, *Lancet*; 356:s28
- (108) Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J, 2006, Reduce diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by metagenomic approach; *Gut* 55; 205-211
- (109) Recht MI, Puglisi JD, 2001, Aminoglycoside resistance with homogenous and heterogeneous population of antibiotic-resistant ribosomes, *Antimicrob Agents Chemother*; 45:2414-9
- (110) Geboes K, Dalle I, 2002, Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation, *GUT*; 50:37-42
- (111) Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Lofberg R, 2000, A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis, *GUT*; 47:404-409

8 Elektronische Datenbanken und benutzte Internetseiten

ARB software, ribosomal sequence database und Handhabung:

<http://www.arb-home.de>

NCBI BLAST Homepage:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Ribosomal Database Project II:

<http://rdp.cme.msu.edu/>

DOTUR:

<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/DOTUR.html>

CLUSTAL X:

<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>

DNADIST/PHYLIP:

<http://evolution.genetics-washington.edu/PHYLIP.html>

9 Anmerkung zu den Sequenzen

Die neu entdeckten Sequenzen wurden in der Gen Bank gespeichert und haben die Zuordnungsnummern EU056368 bis EU056533 bekommen.

10 Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Prof. Dr. S. Schreiber.

Ein besonderer Dank geht an meine Ansprechpartner Dr. A. Rehman der mir bei allen Laborfragen geholfen hat, Dr. T. Kühbacher ohne sie hätte die Arbeit nie dieses Format bekommen und Dr. S. Ott für die zahlreichen Tipps. Für praktische Hilfe bedanke ich mich bei Meike Barche und allen Mitarbeitern des Institutes für klinische Molekularbiologie. Auch möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten.

11 Lebenslauf

- geboren am 30.08.1978 in Rostock
- 1985 –1997 Schulbesuch mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife am Wossidlo Gymnasium Ribnitz - Dammgarten
- 1997-1998 Zivildienst Universitätsklinikum Rostock
- 1998-2001 Ausbildung zum Krankenpfleger am Friedrich Ebert Krankenhaus Neumünster
- 2001-2007 Studium der Medizin an der Christian Albrechts Universität Kiel
- seit 2005 Promotionsarbeit am Institut für klinische Molekularbiologie Kiel
- seit 1.1.2008 Assistenzarzt für Augenheilkunde in der Gemeinschaftspraxis Dr. Pünder, Dr. Kübeck und Dr. Förty, Eckernförde

